บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

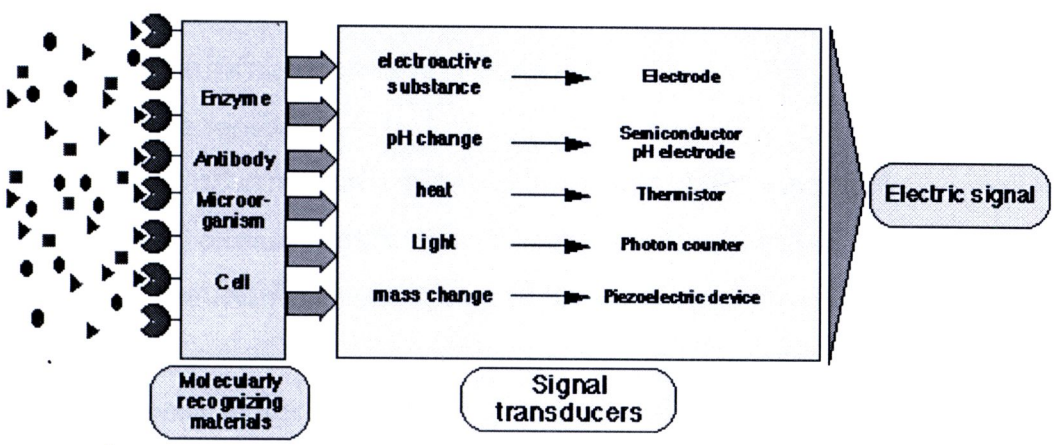
2.1 ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)

ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) เป็นตัววัดทางชีวภาพที่มีการใช้สารชีวโมเลกุล (Biological element) เช่น เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์หรือเซลล์ อยู่ด้วย หรือ เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ขนาดเล็ก (Compact analytical device) ที่มีการใช้สารชีวโมเลกุลหรือสารที่ได้จากสารชีวโมเลกุลซึ่งสามารถตรวจจับปฏิกิริยาได้อยู่ภายใน หรือเป็น transducer ชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยวัตถุประสงค์ทั่วไปของไบโอเซนเซอร์ คือเพื่อตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้นซึ่งจะแปรตามปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ

2.1.1 โครงสร้างและการทำงานของไบโอเซนเซอร์

โครงสร้างของไบโอเซนเซอร์ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ

1. *ส่วนของสารชีวภาพ* จะต้องมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวัด
2. *ส่วนของตัววัดสัญญาณหรือทรานส์ดิวเซอร์* ทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารชีวภาพกับสารที่ต้องการวัดวิเคราะห์ ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์



ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างและหลักการทำงานของไบโอเซนเซอร์ (Biosensor)
(ที่มา : http://www.biomed.in.th/biosensor)

2.1.2 สารที่ต้องการตรวจวัดหรือสับสเตรท (The Analyte or Substrate)

สารที่ต้องการวัดวิเคราะห์หรือสับสเตรท ที่สามารถตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์มีจำนวนมากมายหลายชนิดซึ่งอาจจะเป็นสารที่ถูกใช้ (consumed) หรือถูกผลิตขึ้น (produced) ในกระบวนการทางชีวเคมี ยกตัวอย่างเช่น สารจำพวกน้ำตาล ยูเรีย โปรตีน เอทธานอล เพนนิซิลิน และกรดอะมิโนหลายชนิด เป็นต้น

2.1.3 สารชีวภาพ (The Biological Component)

สารชีวภาพที่นำมาใช้ในไบโอเซนเซอร์คือวัสดุที่มีความไวทางชีวภาพ (biological sensing element) ทำหน้าที่จับหรือเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรทอย่างจำเพาะเจาะจง เกิดเป็นสัญญาณชี้นำ (indicated signal) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าโดยทรานส์ดิวเซอร์ (transducer) ได้ สารชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ในงานไบโอเซนเซอร์ส่วนใหญ่คือเอนไซม์ นอกจากนี้เช่น จุลินทรีย์ เนื้อเยื่อพืชและสัตว์ แอนติเจน แอนติบอดี สารรีเซพเตอร์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ สารจำพวกโปรตีน เป็นต้น

2.1.4 ทรานส์ดิวเซอร์ (Transducer / Detector Device)

ทรานส์ดิวเซอร์ ทำหน้าที่รับและแปลงสัญญาณทางเคมี ฟิสิกส์ หรือชีวเคมี (สัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารทางชีวภาพกับสารที่ต้องการวิเคราะห์) ให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้าที่สามารถตรวจจับได้ และนำไปขยายหรือแสดงผลต่อไป

2.1.5 ชนิดของไบโอเซนเซอร์

ไบโอเซนเซอร์ แบ่งตามสารชีวภาพที่นำมาใช้ได้ดังนี้

1. Enzyme sensor

ใช้เอนไซม์เป็นสารชีวภาพ ตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไป เช่น การตรวจระดับกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ glucose oxidase การหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยใช้เอนไซม์ cholesterol oxidase เป็นต้น เอนไซม์ที่ใช้อาจตรึงอยู่บนทรานส์ดิวเซอร์หรือบน Oxygen electrode โดยตรงก็ได้

2. Microbial sensor

ใช้เซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์เป็นสารชีวภาพ เช่น *E.coli* เพื่อหาปริมาณยา

ปฏิชีวนะ tetracycline hydrochloride โดยเซลล์หรือเชื้อจุลินทรีย์ทำหน้าที่เป็นแหล่งเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้เอนไซม์โดยตรง คือ ไม่ต้องแยกเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ออกมาจากเซลล์ ไม่ต้องเติมสารที่ช่วยการทำงาน (cofactor) ของเอนไซม์ แต่ข้อเสียอาจเกิดจากการที่เซลล์ที่ใช้มีเอนไซม์หลายชนิด ทำให้ความจำเพาะเจาะจงน้อยลงไป

3. Bioaffinity sensor

ใช้แอนติบอดี (Antibody-based biosensor) หรือ รีเซพเตอร์ (Receptor-based biosensor) เป็นสารทางชีวภาพ อาศัยการจับตัวกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี หรือ รีเซพเตอร์กับลิแกด์ (Analytes) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางมวลหรือความถี่ที่สามารถตรวจจับได้โดยทรานส์ดิวเซอร์ชนิด Piezoelectric crystal

4. DNA/RNA sensor

ใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป็นสารทางชีวภาพ โดยอาศัยหลักการการเข้าจับกันของเบสที่เป็นคู่สมกัน ซึ่งเตรียมได้จากการตรึงนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ทราบลำดับเบสแน่นอนลงบนพื้นผิววัสดุรองรับ เรียกสายนิวคลีโอไทด์นี้ว่า ดีเอ็นดี/อาร์เอ็นเอโพรบ

ไบโอเซนเซอร์แบ่งตามทรานส์ดิวเซอร์ที่ใช้ได้ดังนี้

1. Potentiometric biosensor

ทำหน้าที่ตรวจวัดจำนวนประจุที่เกิดขึ้นในภาวะสมดุลไบโอเซนเซอร์ หรือ Ion selective electrode (ISE) ซึ่งมีความจำเพาะต่ออิออน และใช้เมมเบรนเป็นตัวเลือกเฉพาะสารชี้นำชนิดเดียว เช่น pH electrode มีชั้นเมมเบรนที่จำเพาะสำหรับโปรตอน (H^+) และประจุของอิออนมีผลต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่าง working electrode กับ reference electrode ในสภาวะสมดุล

2. Amperometric biosensor

ทำหน้าที่วัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากที่มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสารตัวอย่างเข้าสู่อิเล็กโทรดเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์โดยการเร่งของเอนไซม์

3. Optical biosensor

เป็นการใช้เทคโนโลยีด้าน Optics และ Optoelectronics มาประยุกต์ใช้ ทำให้มีข้อดีเพิ่มขึ้น ทั้งด้านความปลอดภัยจากสารเคมีและลดการรบกวนจากสารภายนอก เครื่องมือที่ผลิตได้มีขนาดเล็กลง น้ำหนักเบา และราคาถูกลง จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากขึ้นเรื่อยๆ อาศัยคุณสมบัติทางแสง ได้แก่ การดูดกลืน (Absorption) การผ่านของแสง (Transmission) การ

สะท้อนของแสง (Reflection) และการเรืองแสง (Fluoresce) เป็นต้น ตัวอย่างเครื่องมือที่ใช้ได้แก่ pH sensitive dye ในการวัด pH ซึ่งมีหัววัดขนาดเล็กมาก ทำงานโดยเมื่อมีการนำเอาสารที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH มาตรึงที่ปลายหัววัดที่เป็น optic fiber เมื่อ pH เปลี่ยนจะทำให้สารดังกล่าวเปลี่ยนแปลงสีและทำให้คุณสมบัติของแสงที่มาจากแหล่งกำเนิดแสงเปลี่ยนไปด้วย สามารถตรวจจับการเปลี่ยนแปลงนี้โดย detector หลักการทำนองเดียวกันสามารถประยุกต์ใช้กับงานวัดปริมาณก๊าซพิษ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซออกซิเจน และโลหะหนักได้

4. Piezoelectric crystal biosensor

มีหลักการคือ อาศัยคุณสมบัติในการเป็น piezoelectricity ของผลึก เมื่อมีแรงกลมากระทำต่อผลึก จะทำให้เกิด electric dipoles มีความต่างศักย์ หรือ dipole moment แสดงออกโดยการสั่น (oscellate) และเกิดความถี่ของการสั่นที่ตรวจจับได้โดย frequency counter ผลึกที่ใช้กัน ได้แก่ quartz, tourmarine, Rochelle salt, ceramics และสารโพลีเมอร์บางชนิด

เมื่อนำสารชีวภาพ (ส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดี) มาตรึงที่ผิวหน้า piezoelectric crystal และเกิดปฏิกิริยากับสารที่จำเพาะที่ต้องการตรวจวัด (ได้แก่ แอนติเจน) ก็จะเกิดเป็น Ag-Ab complex ซึ่งมีมวลเพิ่มขึ้น ผลึกจะเกิดการสั่นสะเทือน ความถี่ที่เกิดจะขึ้นกับปริมาณแอนติเจน ข้อดีของไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้ คือ ขนาดเล็ก เหมาะกับการใช้งานภาคสนาม ราคาไม่แพง มี sensitivity และ specificity สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

การประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดยาฆ่าแมลง ฮอร์โมน ยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในอาหาร สารพิษ หรือสารใดๆ ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ บางครั้งจึงเรียกว่า Immunosensorปัจจุบันมีการศึกษาทางด้าน genetics และมีการเตรียม probe ที่จำเพาะกับยีน รีเซพเตอร์ หรือสารพันธุกรรมอื่น จึงมีการผลิตเป็น Gene sensor ด้วย

5. Other biosensor

สารบางชนิด ปกติมีสภาพการนำไฟฟ้าเป็นกลาง แต่เมื่อเกิดปฏิกิริยาทางเคมีจะให้สารผลิตภัณฑ์ที่นำไฟฟ้าได้ เช่น ยูเรีย (Urea) เมื่อถูกย่อยโดยยูรีเอส (Urease) จะให้ NH_4^+, HCO_3^- ที่นำไฟฟ้าได้ ทำให้สภาพการนำไฟฟ้าของสารละลายเปลี่ยนไป ดังนั้นจึงใช้ทรานส์ดิวเซอร์ชนิด Conductimeter วัดเป็นเชิงปริมาณได้

2.1.6 คุณลักษณะของไบโอเซนเซอร์

คุณลักษณะโดยทั่วไปของไบโอเซนเซอร์มีดังนี้

1. ความสามารถในการคัดเลือก (selectivity) เป็นแฟคเตอร์ที่แสดงถึงความสามารถของไบโอเซนเซอร์ในการคัดเลือกระหว่างสับสเตรทที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นกับธรรมชาติของสารชีวภาพที่ถูกนำมาตรึงบนทรานส์ดิวเซอร์
2. ความไวในการตรวจวัด (sensitivity) เป็นแฟคเตอร์ที่แสดงถึงขีดความสามารถของไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัด ซึ่งความไวของเซนเซอร์จะหมายถึง การเปลี่ยนแปลงในสัญญาณการตอบสนองของเซนเซอร์ที่เป็นฟังก์ชันกับการเปลี่ยนแปลงในปริมาณของสารที่ถูกตรวจวัด
3. เวลาในการตอบสนอง (response time) ขึ้นกับเทคนิคที่ใช้ในการตรึงสารชีวภาพ ถ้าทำการตรึงสารชีวภาพไว้ในฟิล์มบางของโพลีเมอร์ ไบโอเซนเซอร์ที่ได้จะใช้เวลาในการตอบสนองรวดเร็ว
4. อายุการใช้งาน (woking lifetime) ขึ้นกับความคงตัวของสารชีวภาพ
5. ความสามารถในการวัดซ้ำ (reproducibility) ในการผลิตไบโอเซนเซอร์ทางการค้าจะต้องการไบโอเซนเซอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการวัดซ้ำ ซึ่งขึ้นกับคุณภาพของการเตรียมสารชีวภาพ วิธีการตรึงสารชีวภาพ และอื่นๆ เป็นต้น

2.1.7 ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้ (Biosensors and Applications)

1. ด้านการแพทย์

เซนเซอร์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ด้านการแพทย์ คือ เอนไซม์เซนเซอร์ เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการวัด การใช้หรือการติดตั้งสำหรับการวัดสามารถทำได้ง่าย และที่สำคัญทั้งเอนไซม์และทรานส์ดิวเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์มีขายในเชิงพาณิชย์จึงหามาได้ง่าย การประยุกต์เทคโนโลยีตัวรับส่งสัญญาณมาใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ ที่เกิดจากแบคทีเรีย ไวรัส การวัดปริมาณก๊าซ อิออน และสารเมตาบอไลท์ในเลือด และการประเมินสภาวะของสารเมตาบอไลท์ในผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับสารชีวเคมีอย่างรวดเร็ว เช่น ใช้กลูโคสออกซิเดสเซนเซอร์เป็นไบโอเซนเซอร์ในการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดและในน้ำปัสสาวะสำหรับวินิจฉัยโรคเบาหวาน ยูเรียอิเล็กโทรด ครีเอตินินอิเล็กโทรด (creatinin electrodes) ใช้ในการควบคุมการทำงานของไต โคเลสเตอรอลอิเล็กโทรด (cholesterol electrodes) ใช้สำหรับตรวจวัดและป้องกันการอุดตันของเส้นเลือด

2. ด้านอุตสาหกรรมการผลิตทางอาหาร

ในกระบวนการผลิตทางอาหารต้องการการควบคุมแบบอัตโนมัติ จึงมีความต้องการไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดมากยิ่งขึ้น เพื่อติดตามความเป็นไปในขั้นตอนต่างๆ และเพื่อควบคุมกระบวนการผลิตให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพตามต้องการได้

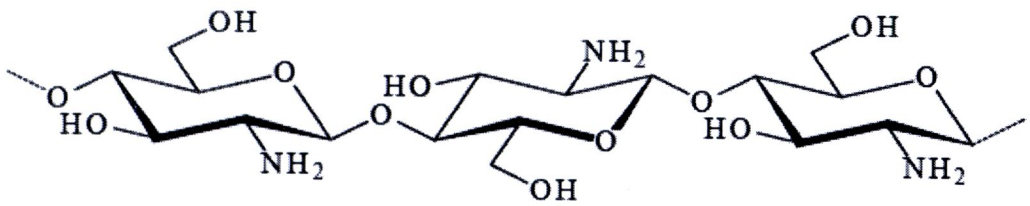
กลูโคสอิเล็กโทรดสามารถใช้ในการตรวจวัดความสดของเนื้อ โดยอาศัยข้อบ่งชี้จากการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของแลคเตทในการควบคุมคุณภาพของไวน์และโยเกิร์ต ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของกลูโคสและเพนิซิลินในกระบวนการหมัก ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโน (เช่น ไลซีน) เพื่อควบคุมปริมาณโปรตีน ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณของแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เป็นต้น

3. ด้านสิ่งแวดล้อม

ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนและมลพิษในน้ำและอากาศ ของเสียจากโรงงาน เช่น การวัดค่าปริมาณการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ (BOD) ในการวัดคุณภาพน้ำ วัดค่าพีเอช ค่าการนำไฟฟ้าสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในการตรวจวัดปริมาณของสารพิษ

2.2 ไคโตซาน

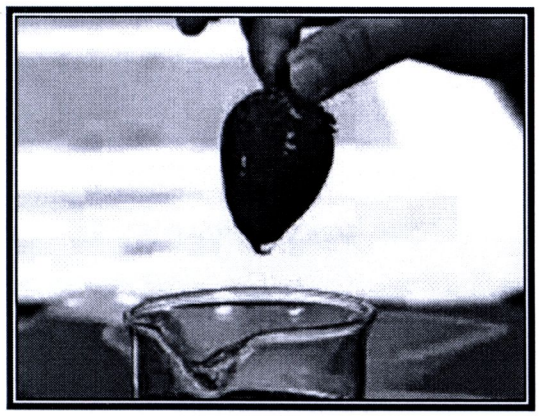
ไคโตซาน (poly [β-(1$\longrightarrow$4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]) คือ อนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่ acetyl ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine (เรียกว่า deacetylation คือ เปลี่ยนน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine เป็น glucosamine) ออกตั้งแต่ 60 % ขึ้นไป และมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน มีการเปลี่ยนหมูฟงกชันที่มีหมูอะเซตามิโด ($-NHCOCH_3$)เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของหมูอะมิโน ($-NH_2$) ที่ตำแหนงคารบอนตัวที่ 2 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคโตซานเปนโพลิเมอรสายยาว มีประจุบวก เนื่องจากเกิดโปรโตเนตหมูอะมิโน (ในรูป $-NH_3^+$) ปกติไคโตซานละลายไดดีในกรดอินทรีย เชน กรดอะซีติก กรดโพรพาโนอิก กรดแลคติก เปนตน pK_a ของไคโตซานขึ้นอยูกับความหนาแนนของโพลิเมอร์ ขอบเขตของความสะเทินของประจุและคาระดับการกำจัดหมูอะซีติล (%DD) ที่มีเศษส่วนโมลเดียวกันกับคูกรดที่ถูกสะเทิน pK_a ของไคโตซานมีคาอยูในชวง 6.2 และ 6.8 สารละลายของไคโตซานมีความเหนียวใส มีพฤติกรรมแบบนอนนิวโตเนียน (non-newtonian) โครงสรางของไคโตซานแสดงไวในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ปกติแล้วไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ในสายโพลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่ acetyl (หรือเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation) นี้มีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไคโตซานซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะมีสายยาวและสารละลายมีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นต้น ดังนั้น การนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด Deacetylation และน้ำหนักโมเลกุล ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาประยุกต์ในด้านต่างๆ อาทิ เช่น

1. ด้านอาหาร ไคโตซานมีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด โดยมีกลไกคือ ไคโตซานมีประจุบวก สามารถจับกับเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่นของเซลล์ ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคโตซานให้เป็นสารที่ใช้เติมในอาหารได้ โดยนำไปใช้เป็นสารกัดบูด สารช่วยรักษากลิ่น รส และสารให้ความข้น ใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ เพื่อรักษาความสดหรือผลิตในรูปฟิล์มที่รับประทานได้ (Edible film) สำหรับบรรจุอาหาร



ภาพที่ 2.3 ประโยชน์ของไคโตซานด้านอาหาร

2. ด้านอาหารเสริม มีรายงานว่าไคโตซานช่วยลดคอเลสเตอรอล และไขมันในเส้นเลือด โดยไคโตซานไปจับกับคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้หรือดูดซึมได้น้อยลง จึงมีการโฆษณาเป็นผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนัก ทั้งนี้ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากไคโตซานสามารถจับ วิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน (วิตามินเอ ดี อี เค) อาจทำให้ขาดวิตามินเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ N-acetyl-D-glucosamine ไปใช้รักษาไขข้อเสื่อม โดยอธิบายว่า ข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่ง glucosamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ proteoglycan และ matrix ของกระดูกอ่อน จึงช่วยทำให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้น

3. ด้านการแพทย์ มีการวิจัยนำแผ่นไคโตซานมาใช้ปิดแผล ช่วยทำให้ไม่เป็นแผลเป็น โดยไคโตซานช่วยลดการ contraction ของ fibroblast ทำให้แผลเรียบ กระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลให้หายเร็วขึ้น

4. ด้านเภสัชกรรม มีรายงานการใช้ไคโตซานเพื่อควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ

5. ด้านการเกษตร เนื่องจากไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจนจะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลอย่างช้าๆ รวมทั้งช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศและดิน จึงใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช และกระตุ้นการนำแร่ธาตุไปใช้ ผลคือสามารถเพิ่มผลผลิตและคุณภาพการผลิตได้ ทำให้เกษตรกรมี ต้นทุนต่ำลง เนื่องจากลดการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 21 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 191027
เลขเรียกหนังสือ

6. ด้านการปศุสัตว์ ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดการติดเชื้อ ทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์เพิ่มขึ้น

7. ด้านการบำบัดน้ำเสีย โดยทั่วไป น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร มีสารแขวนลอยสูง ไคโตซานมีประจุบวก สามารถจับกับโปรตีนและไขมันได้ดี ซึ่งโปรตีนที่ได้สามารถแยกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อไป นอกจากนี้ ไคโตซานยังสามารถดูดซับอิออนของโลหะหนักและจับสี (dye) ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย

8. ด้านสิ่งทอ นำมาขึ้นรูปเป็นเส้นใย และใช้ในการทอร่วมหรือเคลือบกับเส้นใยอื่นๆ เพื่อให้ได้คุณสมบัติการต้านจุลชีพ ลดการเกิดกลิ่นอับชื้น

9. ด้านอุตสาหกรรม ไคโตซาน มีประโยชนอยางมากมายในอุตสาหกรรมอาหาร เชน ใชเสริมใยอาหารธรรมชาติในผลิตภัณฑที่ทำจากแปง ใชเพิ่มความเหนียวแนนให กับผลิตภัณฑแปรรูปจากเนื้อสัตว ใชเพิ่มกลิ่นรสใหดีขึ้นในผลิตภัณฑเนื้อสัตว ในอุตสาหกรรมเสนใยกระดาษ สิ่งทอ ก็มีการใชไคโตซาน เชน ใชทำภาชนะบรรจุที่ยอยสลายไดในธรรมชาติ ทำฟลม ถนอมอาหารที่สามารถรับประทานได้ใชในการผลิตผาที่ยอมสีติดทนนาน ใชในกระบวนการผลิตกระดาษ ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพสูง ทนทาน ตอการฉีกขาด หรือผลิตกระดาษที่ซับหมึกไดดีเพื่อการพิมพที่ตองการคุณภาพสูง

10. ด้านความสวยความงาม คุณสมบัติที่ไมละลายน้ำและอุมความชื้นไดดีจึงพัฒนานำมาทำผลิตภัณฑบำรุงผิว และดูแลเสนผม ยาสีฟน เครื่องสำอาง โดยเฉพาะนำไปใสในเครื่องสำอางที่มีสวนผสมของกรดผลไมธรรมชาติ หรือ AHA ชวยกระตุนใหผิวหนังเกาหลุดลอก ไคโตซานยังถูกนำมาเปนสารเพิ่มความข้นเหนียวในครีม เปนสวนผสมในโลชั่น เพื่อเพิ่มความ ชุมชื้นและความเนียนนุม เปนสวนผสมในแชมพูสระผม ครีมนวดผมและครีมปรับสภาพผม เนื่องจากมีคุณสมบัติ ความหนืด และการเคลือบ โดย ไคโตซานจะก่อตัวเป็นฟลมเคลือบเสนผมไวเพื่อชวยเก็บความชุมชื้นทำใหเสนผมคงสภาพนุมสลวยไมเสียงาย

2.2.1 การผลิตไคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมี (No และ Meyers, 1997)

การผลิตไคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมีทำโดยการใช้สารเคมี เช่น ด่างและกรด โดยมีหลักการที่สำคัญคือ

1. กระบวนการกำจัดโปรตีน (Deproteination)

กำจัดโปรตีนโดยการทำปฏิกิริยากับด่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3-5 % ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 2-3 ชั่วโมง ในกระบวนการนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกขจัดออกไปจากวัตถุดิบ พร้อมกันนี้บางส่วนของไขมันและรงควัตถุบางชนิดมีโอกาสถูกขจัดออกไปด้วย

2. <u>กระบวนการกำจัดเกลือแร่</u> (Demineralization)

กำจัดเกลือแร่โดยการนำวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนมาแล้ว มาทำปฏิกิริยากับกรด ซึ่งส่วนมากใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 3-5 % ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน ทำให้เกลือแร่ส่วนใหญ่ ได้แก่ หินปูน (calcium carbonate, $CaCO_3$) ซึ่งจะถูกกำจัดออกไปโดยเปลี่ยนไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ขั้นตอนนี้โปรตีนและรงควัตถุที่ละลายในกรดจะถูกกำจัดออกไป

3. <u>กระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซีติล</u> (Deacetylation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ใช้ในการกำจัดหรือลดหมู่อะซีติล (CH_3CO-) ที่มีอยู่บนโมเลกุลของไคติน เพื่อให้เกิดเป็นไคโตซาน ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน (-NH_2) บนโมเลกุลของไคตินและหมู่อะมิโนนี้มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลายซึ่งช่วยให้การละลายดีขึ้น เพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก (Cation) ส่วนใหญ่เมื่อปริมาณของหมู่อะซีติลถูกกำจัดไปมากกว่า 60% ขึ้นไป สารไคโตซานที่ได้สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด การลดหมู่ อะซีติลกระทำได้โดยใช้ด่างที่เข้มข้นสูงตั้งแต่ 40% ขึ้นไป ดังนั้นพารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติล (degree of deacetylation , %DD) สามารถทำได้โดยการแช่ไคตินในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (40-50%) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า ทำให้หมู่อะซิทิลบางส่วนหรือทั้งหมดจะถูกดึงออกจากโพลิเมอร์ (Muzzarelli, 1977)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไคโตซาน ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของด่าง สภาวะในการผลิตไคติน บรรยากาศและอัตราส่วนของไคตินต่อสารละลายด่างเข้มข้น ซึ่งรายละเอียดมีดังนี้

ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดึงหมู่อะซิทิล (No และ Meyers, 1997)

เมื่อกล่าวถึงอิทธิพลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาการดึงหมู่อะซิทิลนั้น Lusena และ Rose (1953) พบว่า อุณหภูมิสูงทำให้เปอร์เซ็นต์การดึงหมู่อะซิทิลเพิ่มขึ้น แต่ขนาดโมเลกุลจะลดลง นอกจากนี้ Peniston และ Johnson (1980) อธิบายความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างส่วนกลับของอุณหภูมิและลอกการิทึมของอัตราการเกิดปฏิกิริยา

ผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาดึงหมู่อะซิทิลและความเข้มข้นของด่าง

Wu และ Bough (1978) ทำการทดลองโดยแช่ไคตินใน 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 100องศาเซลเซียส และพบว่าปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 ชั่วโมงแรก โดยมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (%DD) ประมาณ 68% และอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะช้าลง ซึ่งค่า %DD เท่ากับ 78% หลังแช่ไคตินในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่า ที่สภาวะดังกล่าว การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งหากแช่ในด่างเข้มข้นนานกว่านั้นไม่ทำให้ %DD เพิ่มมากขึ้น แต่จะทำให้สายโซ่ของไคโตซานสั้นลง (อ้างอิงโดย No และ Meyers, 1997)

Lertsutthiwong และคณะ (2002) พบว่า ปฏิกิริยาการดึงหมู่อะซิทิลสามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งจากการทดลองให้ผลในทิศทางเดียวกับ Wu และ Bough (1978) โดยพบว่าเมื่อแช่ไคตินใน 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก โดยค่า %DD ที่ได้ประมาณ 75% อย่างไรก็ตาม %DD จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานเพิ่มเติมว่า การผลิตไคโตซานที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้ได้ %DD อย่างน้อย 85% สามารถกระทำได้โดยการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ อะซิทิล 2 ครั้ง (double deacetylation) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Roberts (1997); Chinadit และคณะ (1998)

อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิทิลโดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ต่ำเกินไปจะมีผลต่อการละลายของไคโตซานในสารละลายกรดอ่อน ซึ่ง Alimuniar และ Zainuddin (1992) อ้างอิงโดย No และ Meyers (1997) พบว่า ไคโตซานที่ผลิตจากกระบวนการที่ใช้สารละลายด่างที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 45% ไม่สามารถละลายในกรดอ่อนแม้ว่าจะแช่ไคตินในด่างนานถึง 30 วัน

Bough และคณะ (1978) ทำการตรวจสอบผลของระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิทิลต่อความหนืดและน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งผลการทดลอง พบว่า ไคโตซานที่ผ่านกระบวนการกำจัด

หมู่อะซิทิลด้วย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 145-150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จะให้ค่าความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าไคโตซานที่ผ่านการกำจัดหมู่อะซิทิล ในสภาวะเดียวกันนาน 15 นาที โดยการทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกับ Benjakul และ Wisitwuttikul (1994)

2.2.2 การสกัดไคโตซานจากไคตินด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

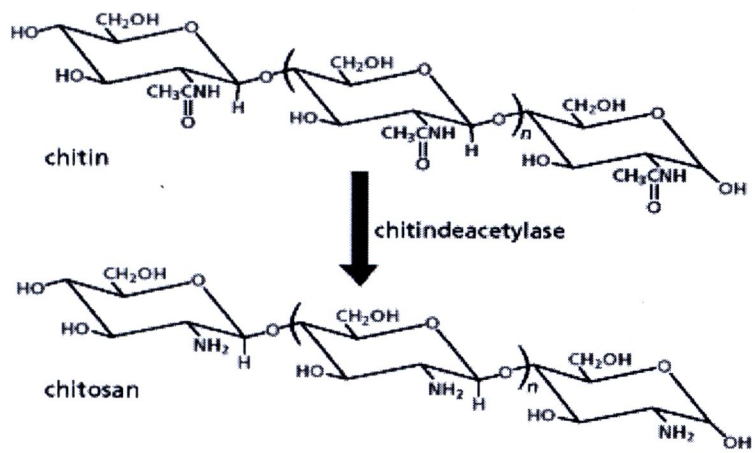
การสกัดไคโตซานจากไคตินด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้น มีหลักการที่สำคัญคือ (Roa และคณะ, 2000)

1. การกำจัดโปรตีนและแคลเซียมคาร์บอเนต

กำจัดโปรตีนและแคลเซียมคาร์บอเนตโดยการหมักกับแบคทีเรียที่มีเอนไซม์โปรติเอสและให้กรดแลกติกเป็นผลพลอยได้ในการสลายแคลเซียมคาร์บอเนต

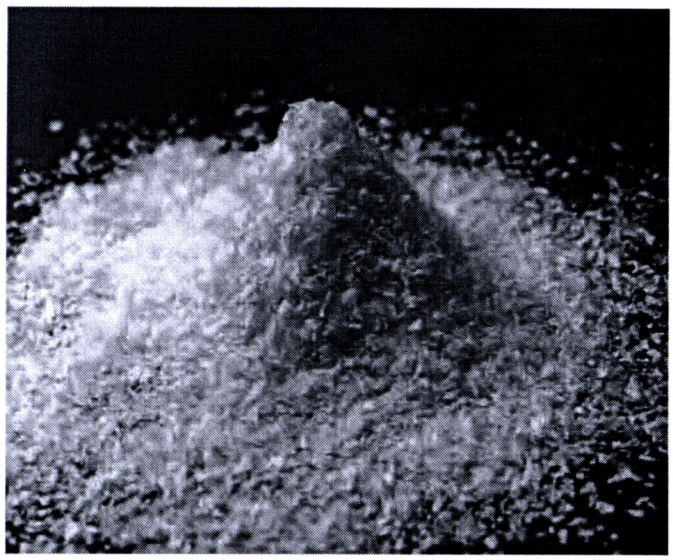
2. การใช้เอนไซม์ chitindeacetylase

ในการลดหรือกำจัดหมู่อะซิทิลออกจากไคตินในปฏิกิริยา deacetylation โดยใช้เอนไซม์chitindeacetylase ซึ่งทำในระดับห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลโดยการใช้เอนไซม์ chitindeacetylase

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 2.5 ผงไคโตซานที่ได้จากปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิล

2.2.3 คุณสมบัติของไคโตซาน

ไคโตซานมีลักษณะพิเศษในการนำมาใช้ดูดซับและจับตะกอนต่างๆ ในสารละลายแล้วนำสารกลับมาใช้ใหม่ได้ซึ่งเป็นการหมุนเวียนตามระบบธรรมชาติ ดังนั้นข้อดีของไคโตซานในการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ มีประสิทธิภาพสูงในกิจกรรมชีวภาพ ราคาถูก และถูกย่อยสลายได้เองอย่างช้าๆ ตามธรรมชาติ (Lopez-Leon และคณ; 2005) การใช้ไคโตซานที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโน และหมู่ไฮดรอกซิลทำให้เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นตัวพยุง (support) ได้ดีเทียบเท่ากับหรือดีกว่า crystalline cellulose ซิลิกาเจลและโพลิเอไมด์ ไคโตซานในรูปเม็ด และ cross-link ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเทคนิคการวิเคราะห์ และแยกสารโดยเฉพาะสารชีวภาพ เช่น แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ในไบโอรีแอกเตอร์ (bioreactor) ไบโอเซนเซอร์ (biosensor) และเป็น ligand carrier สำหรับ affinity chromatography และเนื่องจากไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่ไม่มีอันตรายสามารถขึ้นรูปได้หลากหลาย ดังนั้นจึงถูกใช้เป็น carrier สำหรับการตรึงเอนไซม์ เช่น glucose isomerasec และเซลล์

2.2.4 อนุภาคนาโนไคโตซาน

การเตรียมไคโตซานจะได้อนุภาคที่มีขนาดที่ใหญ่ เรียกว่า ไมโครสเฟียรส์ (microspheres) ซึ่งในปัจจุบันการประยุกต์ใช้งานไคโตซานได้มีความก้าวหน้าถึงระดับที่เล็กมาก ที่เรียกว่า ระดับนาโนเมตร ซึ่งอนุภาคนาโนนี้จะมีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ มากมาย เช่น เมื่อทำให้มีขนาดเล็กลงในระดับอนุภาคนาโนขนาด 100 นาโนเมตรจะช่วยเพิ่มคุณสมบัติให้สารป้องกันยูวีทำหน้าที่ป้องกันผิวได้นานขึ้น (รศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง, 2550)

จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) จะพบว่าอนุภาคนาโนไคโตซานมีลักษณะเป็นทรงกลม (nanoparticle) ซึ่งขนาดอนุภาคคอลลอยด์นั้นมีความสำคัญ โดยระดับอนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าไมโครสเฟียรส์ที่มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่า ขนาดของอนุภาคนั้นจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไคโตซาน โดยที่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้ จะทำให้ได้ขนาดของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งไคโตซานนั้นได้รับความสนใจในการนำมาใช้เพื่อตรึงกับโปรตีนและเอนไซม์ โดยการศึกษาอนุภาคขนาดนาโนไคโตซานด้วยการเตรียมสารละลายไคโตซานกับ Tripolyphosphate (TPP) จะเกิดการเชื่อมกันระหว่าง phosphoric กับ ammonium ไอออน ซึ่งบ่งบอกได้ว่า Tripolyphosphoric group ของTPP นั้นได้เชื่อมกันกับ ammonium group ของไคโตซานนั่นเอง (อานุภาพ ทองธรรมชาติ และ สมนึก จารุดิลกกุล; http://www.intania. com/upload/NA06.pdf)

2.3 เอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

ภาพที่ 2.6 เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP)
(ที่มา : http://biochem.dental.upenn.edu/)

ฟอสฟาสเทส (Phosphatase) เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ที่จัดอยู่ในพวกไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแยกพันธะของเอซิลเอสเธอร์ (Acyl ester) และฟอสฟอริลเอสเธอร์ (phosphoryl ester) ในสารประกอบอินทรีย์ฟอทเฟทเอสเทอร์ และขณะที่เกิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว พันธะระหว่างไฮโดรเจน และออกซิเจนในโมเลกุลของน้ำจะแยกออกจากกันด้วย ได้ แอลกอฮอล์ และฟอสเฟตอิออน

เอนไซม์ฟอสเฟตที่มีความสำคัญทางการแพทย์ มีอยู่ 2 ชนิด คือ

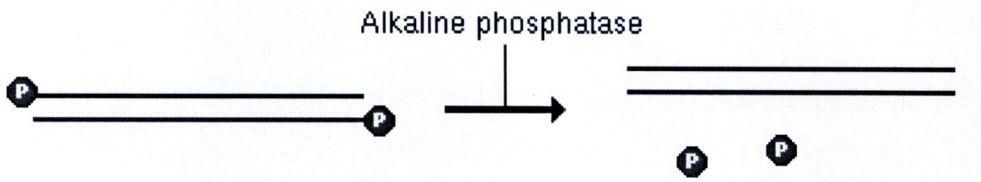
1. Alkaline phosphatase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะเป็นด่าง
2. Acid phosphatase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะเป็นกรด

2.3.1 หนาที่ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP)

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) มีหนาที่เรงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำใหสารอินทรียแยกตัวออก หรือเรงใหมีการเคลื่อนยายหมูฟอสเฟต (transphosphorylation)จากปลาย 5’ และปลาย 3 ’จากโมเลกุลหลายชนิด เชน สายนิวคลีโอไทด โปรตีนและ อัลคา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ลอยด ปจจุบันยังพบว่า ALP สามารถทำให้เกิด detoxification endotoxin ของแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วย (Poelstra, 1997) เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) ของกระดูกจะทำงานอยู่นอกเซลล ทำให้บางสวนมาอยู่ในเลือด เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) ทำหน้าที่เกี่ยวของกับการสังเคราะห fibrous protein เกี่ยวของการเตรียมกอนมีการสรางกระดูก (pre-osseous bone matrix) เอนไซมนี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห mucopolysaccharide ที่อยู่ระหวางเซลล เบื้องตนพบวากรดไรโบนิวคลีอิกอาจจะมีหนาที่ควบคุมกิจกรรมของ ALP



ภาพที่ 2.7 การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสกับสายนิวคลีโอไทด์ (ที่มา : http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/phosphatase .html)

2.3.2 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสหรือ ALP สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิดในร่างกาย เช่น ไต ตับ เซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก กระดูก และรก โดยเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของสารประกอบที่มีพันธะ phosphomonoester ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH 8-11) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$R\text{-}PO_4^{2-} + H_2O \xrightarrow{\text{Alkaline Phosphatase}} R\text{-}OH + HPO_4^{2-}$$

ปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส

ในการติดตามการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสนี้สามารถทำได้ 2 วิธี (ที่คล้ายคลึงกัน) คือ

1. ใช้ disodiumphenylphosphate (DPP) เป็นสับสเตรท ซึ่งจะให้ผลผลิต คือ ฟีนอล (phenol) การติดตามผลผลิต คือ หาปริมาณฟีนอลที่เกิดขึ้น

ซึ่งทำได้โดยเติม phenol reagent อันประกอบด้วย phosphotungstic acid, phosphomolybdic acid และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หรือ

2. ด้วยวิธีของ Bowers and Mc Comb Procedure

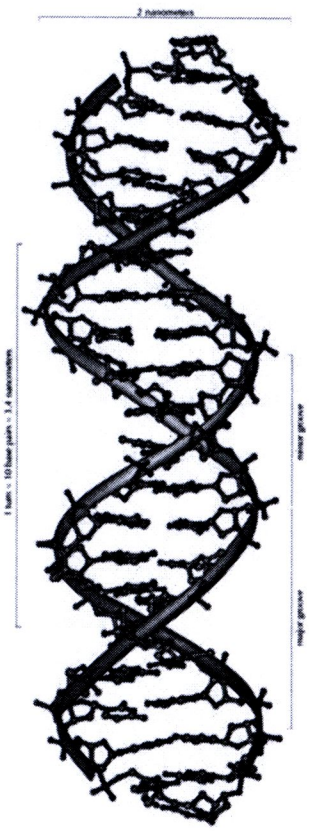
p-NPP + AMP ⟶ ALP pH 10.35(Mg/Zn) ⟶ p-NP +AMP + PO_4

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสจะ catalyze ปฏิกิริยา transphosphorylation ของ p-Nitrophenylphosphate (p-NPP) ไปเป็น p-Nitrophenol (p-NP) โดยมี transphosphorylating buffer คือ 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) ร่วมด้วย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเร่งด้วย Mg^{2+} หรือ Zinc ion การเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงมีสาเหตุมาจากการเกิด p-NP นั้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส

2.4 DNA

ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นชื่อย่อของสารพันธุกรรม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ได้แก่ คน, สัตว์, พืช, เชื้อรา , แบคทีเรีย, ไวรัส เป็นต้น

ดีเอ็นเอบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นไว้ ซึ่งมีลักษณะที่ผสมผสานมาจากสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อน ซึ่งก็คือ พ่อและแม่ และสามารถถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไป ซึ่งก็คือ ลูกหลาน



ขนาด และรูปร่าง

ดีเอ็นเอมีรูปร่างเป็นเกลียวคู่ คล้ายบันไดลิงที่บิดตัว ขาของบันไดแต่ละข้างก็คือการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide)

ภาพที่ 2.8 โครงสร้างสายดีเอ็นเอ (ที่มา : http://th.wikipedia.org/ดีเอ็นเอ)

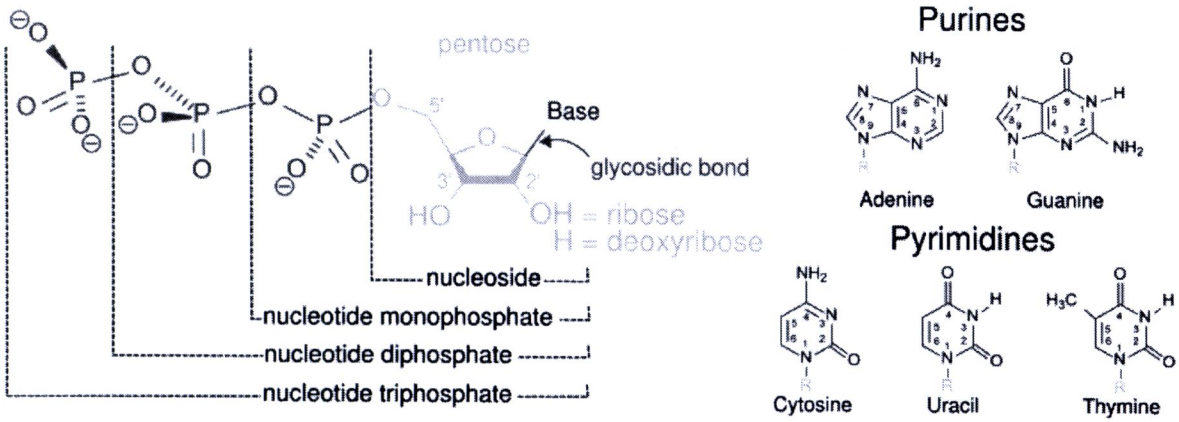
นิวคลีโอไทด์เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาล, ฟอสเฟต (ซึ่งประกอบด้วยฟอสฟอรัสและออกซิเจน) และเบส (หรือด่าง) นิวคลีโอไทด์มีอยู่สี่ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine, A) , ไทมีน (thymine, T) , ไซโทซีน (cytosine, C) และกัวนีน (guanine, G) ขาของบันไดสองข้างหรือนิวคลีโอไทด์ถูกเชื่อมด้วยเบส โดยที่ A จะเชื่อมกับ T และ C จะเชื่อมกับ G เท่านั้น (ในกรณีของดีเอ็นเอ) และข้อมูลทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นจากการเรียงลำดับของเบสในดีเอ็นเอนั่นเอง

รูปร่างของ DNA ในสิ่งมีชีวิตแต่ละประเภทแตกต่างกัน เช่น เซลล์โพรคาริโอต ไวรัส แบคทีเรีย รวมทั้งคลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ที่มี DNA เป็นวงแหวนเกลียวคู่ ส่วนในยูคาริโอต มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่อยู่ในนิวเคลียส เรียก nuclear DNA อยู่ในรูปเกลียวคู่ปลายเปิด และชนิดที่อยู่ในไมโตคอนเดรียเรียก Mitochondrial DNA มีลักษณะเป็นวงแหวนเกลียวคู่ และขดตัวเป็นเกลียวคู่ยิ่งยวด ในพืชพบ DNA ทั้งในนิวเคลียส และคลอโรพลาสต์

ลักษณะที่สำคัญของ DNA

ผู้ค้นพบดีเอ็นเอ คือ ฟรีดริช มีเชอร์ ในปี พ.ศ. 2412 (ค.ศ. 1869) แต่ไม่ทราบว่ามีโครงสร้างอย่างไร จนในปี พ.ศ. 2496 (ค.ศ. 1953) เจมส์ ดี. วัตสัน และฟรานซิส คริก เป็นผู้ไขความลับโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดยทั้งสองได้ค้นพบว่าโครงสร้างตามธรรมชาติของ DNA ในเซลล์ทุกชนิดเป็นเกลียวคู่ซึ่งมีโครงสร้างที่เสถียรที่สุด โดยมีเบสอยู่ด้านในระหว่างสายของ DNA ทั้ง 2 ในลักษณะที่ตั้งฉากกับแกนหลัก และวางอยู่ในระนาบเดียวกัน การที่เบสวางอยู่ในสภาพเช่นนี้ทำให้เบสระหว่างอะดีนีน และไทมีนสามารถเกิดพันธะได้ 2 พันธะ และเบสระหว่างกวานีนกับไซโทซีนเกิดได้ 3 พันธะ ซึ่งการเข้าคู่กันนี้ถ้าสลับคู่กันจะทำให้พลังงานที่ยึดเหนี่ยวไม่เหมาะสมกับการเข้าคู่ เพื่อเกิดเกลียวคู่ของ DNA

ฉะนั้นถ้าการเรียงตัวของเบสใน DNA สายหนึ่งเป็น T-C-C-A-A-G ลำดับการเรียงตัวของเบสในอีกสายหนึ่งจึงต้องเป็น A-G-G-T-T-C เรียกลักษณะนี้ว่าการจับกันของเบสคู่สม (base complementary) จากคุณสมบัตินี้ทำให้การตรวจวัด และวิเคราะห์หาสายดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นไปได้ง่าย และมีความถูกต้องแม่นยำมาก อันเป็นแนวทางที่ใช้ในการสร้างเครื่องมือตรวจวัดไบโอเซนเซอร์นั่นเอง



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ และเบสในกลุ่มของ purine และ pyrimidine (ที่มา : http://th.wikipedia.org/นิวคลีโอไทด์)

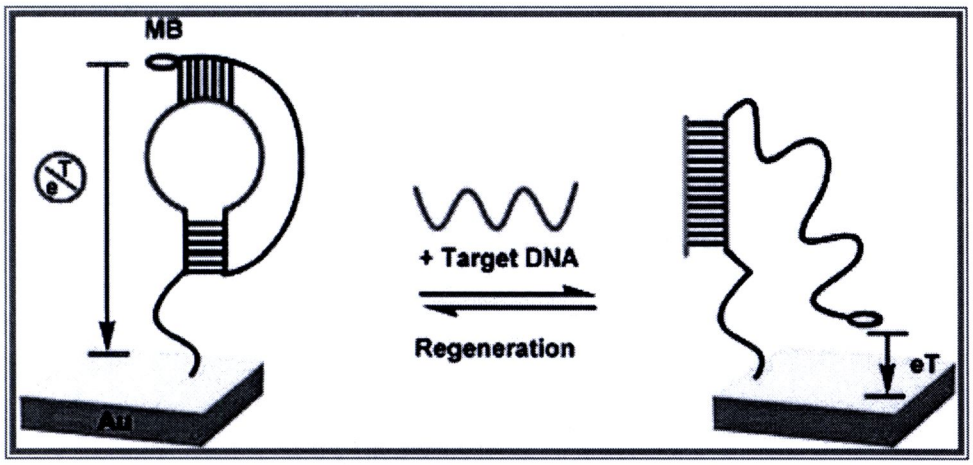
นอกจากนี้ดีเอ็นเอมีคุณสมบัติในการเสียสภาพ (denaturation) และการคืนสภาพ (renaturation) ได้ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสเป็นพันธะอ่อน ดีเอ็นเอจึงสามารถแยกออกเป็นเส้นเดี่ยวได้เมื่ออยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิหรือความเป็นกรดเป็นด่างสูงมากๆ และสามารถคืนสู่สภาพเดิมเมื่อมีการปรับอุณหภูมิ หรือความเป็นกรดเป็นด่างให้ลดลง

2.4.1 DNA sensor

งานวิจัยทางด้านดีเอ็นเอเซนเซอร์มีออกมามากมาย และหลากหลาย ทั้งที่มีการตรวจวัดแบบติดฉลาก (Hashimoto, *et al.*, 1994) หรือไม่ต้องติดฉลาก (Xiao, *et al.*, 2007; Tang, *et al.*, 2006, Li, *et al.*, 2007) โดยนักวิจัยมุ่งเน้นการตรวจวัดที่มีวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว สะดวก และแม่นยำ (Jelen, *et al.*, 2002) และในปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาการตรวจวัด DNA ที่มีความไวมากขึ้น

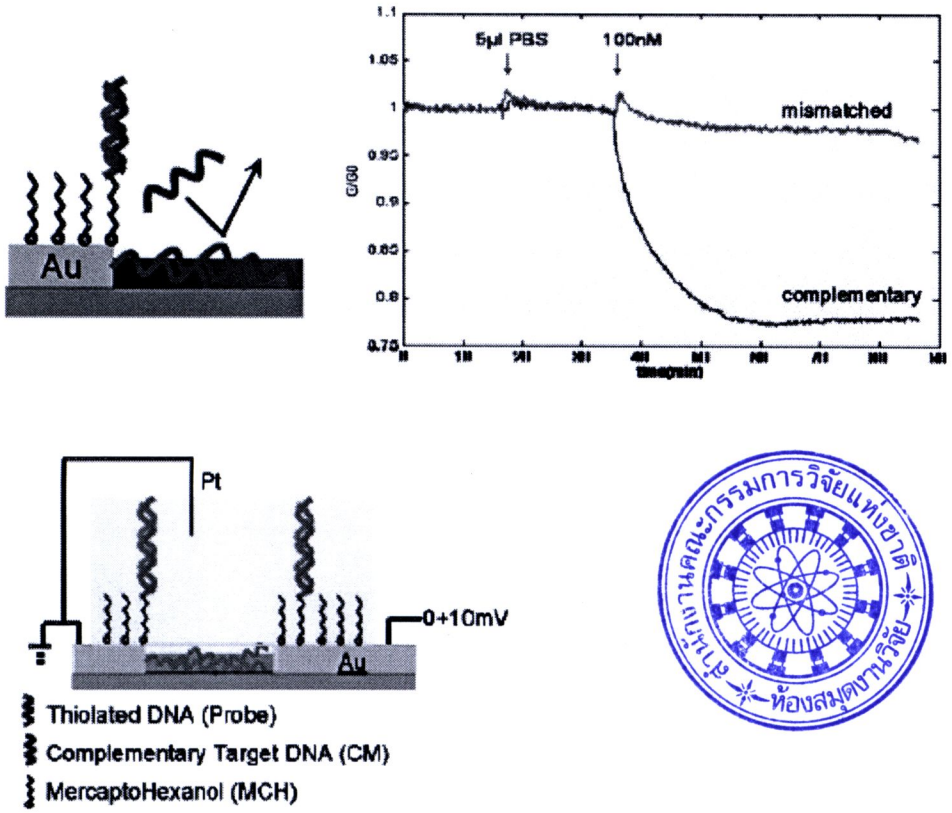
Xiao และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการตรวจวัด DNA ในน้ำเลือด (blood serum) ผ่านการใช้ DNA Pseudoknot และทำการตรวจวัดด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมี ผ่านตัวกลาง methylene blue ถ้าไม่มี target DNA มาเข้าคู่กับ pseudoknot สัญญาณที่ต้องการวัดจะไม่เกิดขึ้น เพราะโครงสร้างของ pseudoknot ไม่เปิดออก ทำให้ methylene blue ไม่สามารถเกิดการนำส่ง electron ได้ ทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณกระแสไฟฟ้าได้ แต่ถ้ามีการเข้าคู่ของ target DNA กับ probe DNA ที่ pseudoknot แล้วนั้น จะเกิดการคลายตัวของ pseudoknot

ทำให้ได้ single-stranded DNA ขึ้น อันส่งผลให้มีการถ่ายเท electron ของ methylene blue ไปยัง electrode ขึ้นทำให้สามารถวัดค่ากระแสไฟฟ้าได้ ดังแสดงในภาพ 2.10 ความเข้มข้นของ DNA ที่วัดได้อยู่ในช่วง 2 – 100 nM



ภาพที่ 2.10 แสดงการทำงานของ E-DNA Sensor ที่ขึ้นอยู่กับรูปลักษณ์ของ DNA Pseudoknot และการทำปฏิกิริยากับ Methylene Blue (MB)
(ที่มา : Xiao, *et al.* 2007)

นอกจากนี้วัสดุนาโนต่างๆ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจวัดของไบโอเซนเซอร์เป็นอย่างมาก หนึ่งในนั้น คือ แท่งคาร์บอนนาโน (carbon nanotube) Tang และคณะ (2006) ได้รายงานถึงการนำเอา single-walled carbon nanotube (SWNT) มาสร้างเป็น DNA sensors (ภาพที่ 2.12) โดยวิธีการตรวจวัดที่ไม่จำเป็นต้องมีการติดฉลาก หรือที่เรียกว่า label-free แสดงให้เห็นถึงการตรวจวัดสาย DNA ที่ 15mer และ 30mer ที่การ hybridization ของสาย DNA จะเกิดขึ้นที่หัววัดทองคำ พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงถึง การกระตุ้นค่าระดับพลังงานระหว่างตัว carbon nanotube กับหัววัดทองคำ เนื่องมาจากการจับคู่กันของสาย DNA ที่ต้องการวัดนั่นเอง ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ค่าการตรวจวัดที่ถูกต้องมาก ขึ้นกับการ hybridization และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปในอนาคตได้อีกทางหนึ่งด้วย



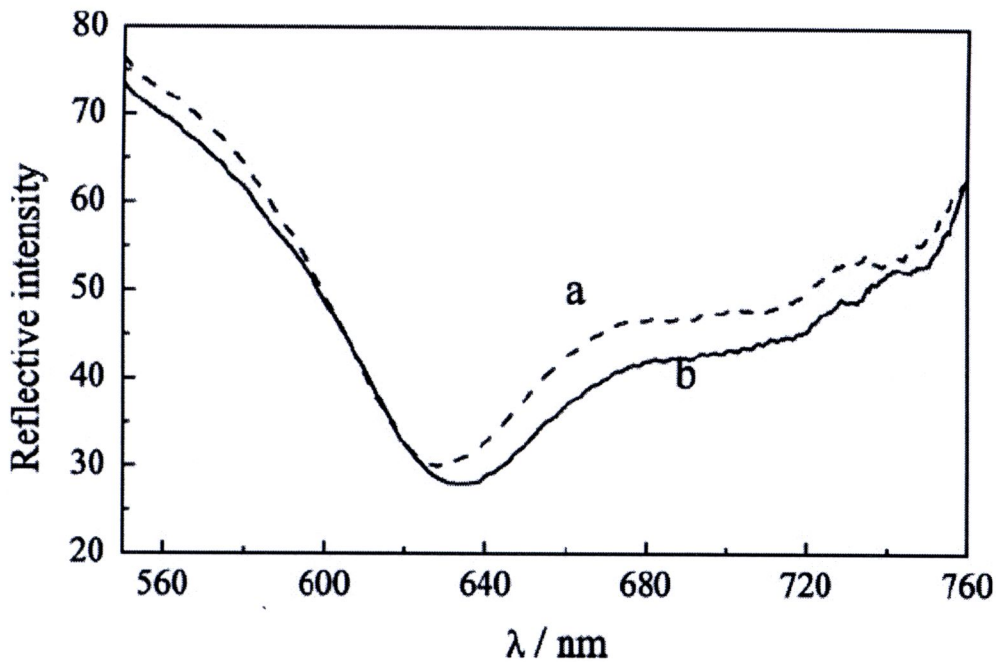
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 2.11 แสดงการทำงานของเครื่องมือ (single device) ในขณะที่ทำการวัด โดยสาย DNA คู่สมจะจับกับ thiolated ssDNA ที่ตรึงอยู่กับ MCH บนแผ่น gold electrode ที่ PBS pH 7.4 ซึ่งสัญญาณที่ได้จะแสดงดังรูปกราฟ

(ที่มา : Tang, *et al.* 2006)

นอกจากนี้การนำสารบางชนิดที่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้มาติดฉลากเพื่อวัดปริมาณหรือแยกความแตกต่างระหว่างสาย DNA ได้นั้นมีใช้กันอย่างแพร่หลายเช่นกัน ทั้งนี้สัญญาณที่วัดได้ยังให้ค่าที่ต่ำด้วย (Hashimoto, *et al.*, 1994) เช่น การนำ Daunomycin ที่สามารถถูก oxidized ได้ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ (446 mV) ด้วยค่าสัญญาณไฟฟ้าที่วัดได้สูง (6.5 µA/cm^2 ในสารละลาย 10 µM) บนหัววัดกราไฟท์ที่มี DNA probe อยู่ การใช้ Daunomycin มาใช้นี้สามารถแยกได้ระหว่าง DNA สายคู่ และสายเดี่ยวโดยใช้ linear sweep voltammetry ซึ่งสามารถวัดปริมาณ DNA ได้ถึง 10^{-8} g/ml ในสารละลายบัฟเฟอร์ การนำ Daunomycin มาใช้นี้ได้ถูกนำไปใช้วัดทางการค้าด้วย ในขณะที่ Jin, et al., 2009 ได้นำ SPR มาใช้ในการตรวจวัด

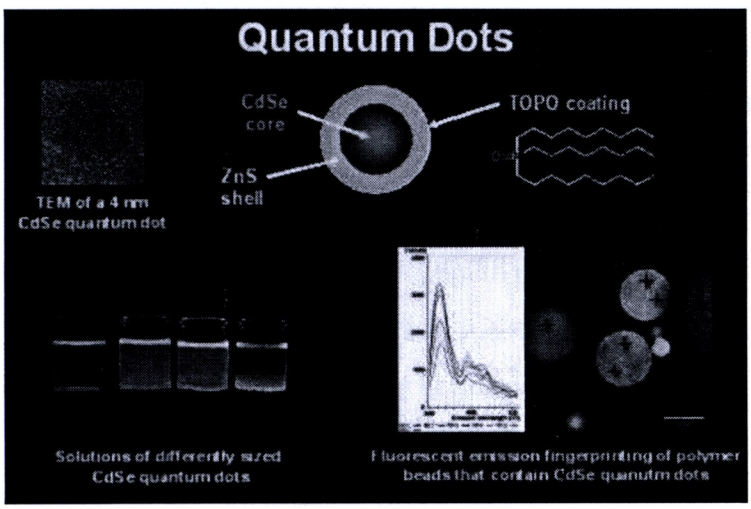
apoptosis-associated genes (bcl-2 และ bax) โดยใช้หลักการวัด DNA นั่นเอง ซึ่งการวัดจะถูกออกแบบให้สามารถวัดแบบ simultaneous
multi-wavelength detection โดยลำดับเบสของ bcl-2 และ bax จะถูกติดฉลากด้วย biotin จากนั้นจะถูกจับกับ avidin ในระหว่างการตรวจวัดนั่นเอง สัญญาณที่ได้จะแสดงให้เห็นดังภาพที่ 2.12 ช่วงค่าการตรวจวัดที่ได้ คือ 50–400 ng/mL สำหรับ bcl-2 และ bax oligonucleotide (20 bases) ส่วน PCR product ของ bcl-2 (405 bases) อยู่ที่ 5–60 ng/mL และสำหรับ bax (538 bases) จะอยู่ที่ 5–40 ng/mL



ภาพที่ 2.12 แสดงค่า Resonant wavelength shift กับระยะเวลาการตรึงของ biotinylated DNA บน avidin-modified surface ของ SPR sensor โดยที่ (a) คือ avidin และ (b) คือ avidin + biotinylated DNA

2.5 ควอนตัม ดอท (Quantum Dots)

ควอนตัม ดอท (Quantum Dots) บางครั้งก็ถูกเรียกว่า ผลึกนาโน (Nanocrystals) เป็นผลึกอนุภาคที่มีขนาดเพียงระดับนาโนเมตร มีคุณสมบัติเป็นสารกึ่งตัวนำ ประกอบขึ้นจากธาตุหมู่สอง-หก (II-VI) สาม-ห้า (III-V) และ สี่-หก (IV-VI) ในตารางธาตุของเพอริออดิก (Periodic table) เช่น แคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) แคดเมียมเซเลไนด์ (CdSe) แคดเมียมเทลลูไรด์ (CdTe) เลดซัลไฟด์ (PbS) เป็นต้น ประกอบไปด้วยอิเล็กตรอนจำนวนระหว่าง 100 - 1,000 อิเล็กตรอน และเป็นโครงสร้างนาโนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ ในช่วงระหว่าง 2 - 10 นาโนเมตร (หรือประกอบไปด้วยอะตอมจำนวนประมาณ 10-50 อะตอม) เมื่อมองโครงสร้างของควอนตัม ดอทนี้ผ่านเครื่องมือที่สามารถสำรวจโครงสร้างระดับนาโนได้ จะเห็นลักษณะเป็นจุด (dot) และเมื่อโครงสร้างของควอนตัม ดอทที่ได้จากสังเคราะห์มีขนาดเล็กระดับนาโนนี้ ทำให้โครงสร้างนี้แสดงพฤติกรรมภายในอะตอมหรือภายในโมเลกุลแบบ ควอนตัม (Quantum) ตามหลักการทางฟิสิกส์ควอนตัม (Quantum physics) คือ มีคุณสมบัติที่เรืองแสงได้ดี ทั้งยังปรับสีของแสงเรืองได้โดยเปลี่ยนขนาดและส่วนประกอบ ความสามารถในการปรับสีได้นี้เป็นสมบัติที่โดดเด่นกว่าสารฟลูออเรสเซนส์อื่น จึงเรียกโครงสร้างนาโนของวัสดุที่มีลักษณะเช่นนี้ว่า ควอนตัม ดอท (หรือเรียกกันอีกชื่อหนึ่งว่าผลึกนาโนของสารกึ่งตัวนำ)

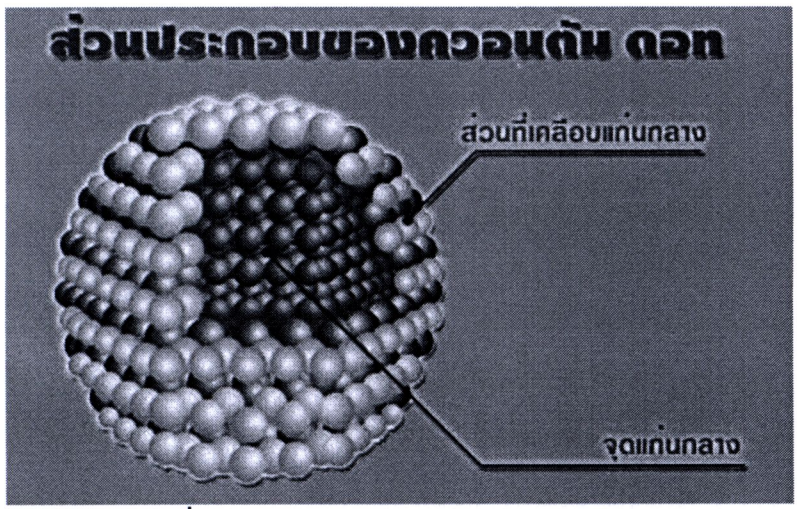


ภาพที่ 2.13 แสดงโครงสร้างและสมบัติการเปล่งแสงของควอนตัม ดอท

(ที่มา : http://famiglieditalia.wordpress.com/2011/03/22/quantum-dot-triplicano-lefficienza-del-solare-econota-53/)

2.5.1 โครงสร้างพื้นฐานของควอนตัมดอท

ควอนตัม ดอท เป็นโครงสร้างนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยโครงสร้างพื้นฐานประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน ดังนี้



ภาพที่ 2.14 แสดงส่วนประกอบของควอนตัม ดอท

(ที่มา : http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/nano/Page/Unit3-9.html)

2.5.1.1 แกนกลาง (core)

เป็นผลึกของธาตุหมู่สอง-หก (II-VI), สาม-ห้า (III-V), และ สี่-หก (IV-VI) ในตารางธาตุของเพอริออดิก (Periodic table) โดยปลูกผลึกให้มีขนาดอยู่ในระดับ 2-10 นาโนเมตร และควบคุมให้มีรูปร่างตามต้องการได้ การเลือกชนิดของเนื้อวัสดุที่ใช้เป็นแกนกลาง เป็นการกำหนดช่วงแสงเรืองของควอนตัม ดอทแบบหยาบ เช่น แคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) จะเรืองแสงในย่านยูวีสีน้ำเงิน แคดเมียมเซเลไนด์ (CdSe) จะเรืองแสงในย่านของวิสิเบิล (Visible) ส่วนรูปร่างและขนาดของอนุภาคจะเป็นตัวปรับความยาวคลื่นของแสงเรืองอย่างละเอียดอีกชั้นหนึ่ง เช่น แกนกลางเป็นแคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นาโนเมตรจะใช้เตรียมควอนตัม ดอทที่เรืองแสงที่ 655 นาโนเมตร ในขณะที่แกนกลางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 3 นาโนเมตรจะใช้เตรียมควอนตัม ดอทที่เรืองแสงที่ 525 นาโนเมตร เป็นต้น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.5.1.2 **เปลือกหุ้มแกนกลาง (shell)**

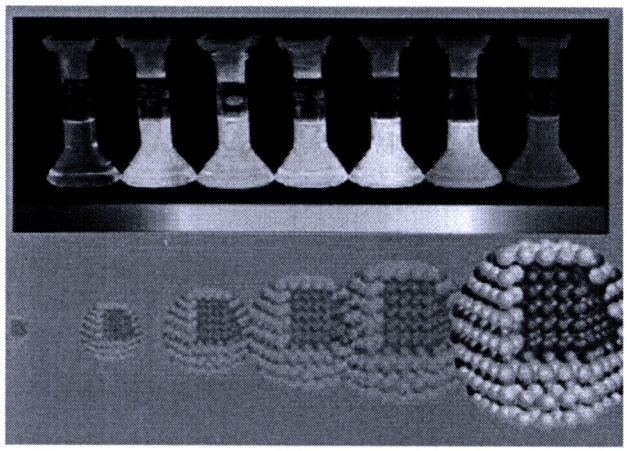
เปลือกหุ้มแกนกลางช่วยทำให้ควอนตัม ดอทสามารถเรืองแสงได้อย่างคงที่ เปลือกหุ้มจะทำหน้าที่ป้องกันและไม่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสง ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) เป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้เป็นเปลือกหุ้มเพราะสามารถปกป้องแกนกลางได้เกือบสมบูรณ์ที่สุด

2.5.2 การกักขัง Electron

การถูกกักขังของอิเล็กตรอนนี้จึงส่งผลให้เกิดระดับการส่งผ่านพลังงานที่ไม่ต่อเนื่อง หรือเกิดเป็นพลังงานแบบควอนตัม ส่งผลให้ค่าระดับพลังงานของอิเล็กตรอนภายในควอนตัม ดอทสามารถควบคุมให้เปลี่ยนไปตามขนาดของควอนตัม ดอทได้ ซึ่งจะพบว่าควอนตัม ดอทที่มีขนาดโครงสร้างเล็ก จะมีช่วงของช่องว่างระหว่างแถบพลังงานอิเล็กตรอน (Energy band gap) ของระดับพลังงานที่กว้างมากกว่าควอนตัม ดอทที่มีขนาดโครงสร้างใหญ่กว่า และโครงสร้างของควอนตัม ดอทที่มีขนาดเล็กกว่าจะมีค่า Exciton Bohr Radius ที่มากกว่าโครงสร้างควอนตัม ดอทที่มีขนาดใหญ่อีกด้วย

2.5.3 คุณสมบัติและพลังงาน

ควอนตัม ดอทจะมีคุณสมบัติที่เห็นได้อย่างชัดเจนในทางไฟฟ้าและทางแสง คุณสมบัติหนึ่งในทางแสงที่เป็นรู้จักและเห็นได้ด้วยตาเปล่า ก็คือ สีสันของควอนตัม ดอท ที่มีการเปลี่ยนแปลงตามระดับขนาดของควอนตัม ดอท โดยที่ควอนตัม ดอทที่มีขนาดต่างๆ กันจะให้สีสันที่แตกต่างกันไปด้วย พบว่าควอนตัม ดอทที่มีขนาดใหญ่จะมีสีสันที่แสดงออกมาอยู่ในขอบเขตของสีแดง และควอนตัม ดอมที่มีขนาดที่เล็กลงลดหลั่นกันลงมาจะมีสีสันอยู่ในขอบเขตของสีน้ำเงิน ซึ่งแถบสีควอนตัม ดอทแสดงออกมานั้นมีความสัมพันธ์กับระดับพลังงานภายในควอนตัม ดอทโดยตรง การที่ควอนตัม ดอทที่มีขนาดใหญ่แสดงสีสันอยู่ในช่วงของสีแดง เนื่องจากว่าอิเล็กตรอนภายในควอนตัม ดอทนั้นมีระดับพลังงานที่มากขึ้น ทำให้ควอนตัม ดอทนี้ดูดกลืนโฟตอนที่มีพลังงานน้อย จึงมีสีที่อยู่ในช่วงด้านปลายของสเปคตรัมสีแดงนั่นเอง



ภาพที่ 2.15 แสดงขนาดและสีของควอนตัม ดอท
(ที่มา : http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/nano/Page/Unit3-9.html)

2.5.4 ประโยชน์ของควอนตัม ดอท

ควอนตัม ดอท สามารถนำมาใช้สำหรับการวินิจฉัยทางด้านการแพทย์ โดยถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ ช่วยในการพิมพ์ภาพทางชีวภาพ (bioimaging) เพื่อระบุตำแหน่งและติดตามศึกษาเซลล์หรือโมเลกุลชีวภาพภายในร่างกายได้ง่าย และมีประสิทธิภาพมากขึ้น ใช้สำหรับเป็นเซ็นเซอร์หรือตัวรับสัมผัสทางชีวภาพ (biological sensors) และนำมาพัฒนาสู่อุปกรณ์คุณสมบัติทางแสงระดับนาโน อย่างเช่น แอลอีดี (LEDs) เป็นต้น